



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย

ผลของอาหารเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ที่ถูกกระตุ้นด้วยลิพอพอลิแซคคาไรด์จาก
พอร์ไฟโรโมนแนสจิงจีวาไลส ต่อการเพิ่มจำนวนการรุกราน และการตายแบบอะพอพโทซิสของ
เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ

(Effects of monocyte conditioning medium induced by *Porphyromonas gingivalis*
lipopolysaccharides on proliferation, invasion and apoptosis of head and neck
cancer cell lines)

โดย

นางสาวอานิตย์ โทนลักษณ์
สังกัดคณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ที่ปรึกษาโครงการวิจัย

ผศ.ทพญ.ดร.กมลพรรณ ภัคดี
สังกัดคณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ : การศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของ lipopolysaccharide จากเชื้อก่อโรคปริทันต์ *P.gingivalis* ต่อการแสดงออกของยีน การแบ่งตัว การรุกราน และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ

วิธีการทดลอง: กระตุ้นเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ THP-1 ด้วย lipopolysaccharide จาก *P. gingivalis* ที่ความเข้มข้น 0-1,000 ng/mg เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเอาอาหารเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นแล้ว เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ชนิดปฐมภูมิ HN18 และชนิดแพร่กระจาย HN17 จากนั้นนำมาวัดการแสดงออกของยีน IL-6 และ IL-8 ทดสอบความสามารถในการแบ่งตัว การรุกราน และการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis โดยวิธี RT-PCR assay, MTT assay, modified Boyden's chamber assay และ Annexin V-FITC flow cytometry assay ตามลำดับ

ผลการทดลอง: เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ที่เลี้ยงร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นแล้ว พบว่ามี การแสดงออกของยีน IL-6 และ IL-8 ความสามารถในการแบ่งตัว การรุกรานเพิ่มขึ้น และมีการตายแบบ apoptosis ลดลงทั้งในเซลล์มะเร็งชนิดปฐมภูมิ และชนิดแพร่กระจาย

สรุปผลการทดลอง: จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าการอักเสบจากเซลล์โมโนไซต์ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อจุลินทรีย์ในช่องปาก *P.gingivalis* มีผลทำให้เซลล์มะเร็งศีรษะและลำคามีความรุนแรงมากขึ้น

คำสำคัญ มะเร็งศีรษะและลำคอ การอักเสบ การแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง อะพอพโทซิส

Abstract

Introduction: The purpose of this study was to investigate the effect of lipopolysaccharide from periodontal pathogen *P. gingivais* on gene expression, proliferation, invasion and apoptosis of head and neck cancer cells. **Method:** Human monocytic cells (THP-1) were activated by *P. gingivais* lipopolysaccharide (0-1,000ng/ml) for 24 hours, then the condition media of activated THP-1 were collected, and co-culture with head and neck cancer cell lines (primary cancer cell line ; HN18 and metastatic cancer cell line ; HN17), The gene expression of IL-6 and IL-8, cell proliferation, invasion and apoptosis were analyzed by RT-PCR assay, MTT assay, modified Boyden' s chamber assay and Annexin V- FITC flow cytometry assay, respectively. **Result:** Head and neck cancer cell lines co-culture with condition media of activated THP-1 showed the expressions of IL-6 and IL-8 were elevated. Proliferation and invasion significantly increased in a dose dependent manner. In addition, LPS activated THP-1 inhibited apoptosis in both primary and metastatic cell lines. **Discussion and Conclusion:** The results suggested that inflammation caused by *P. gingivais* can enhance aggressiveness in both primary and metastatic head and neck cancer cell lines.

Key words: Head and neck cancer, inflammation, proliferation, apoptosis.

1. บทนำ

มะเร็งที่ศีรษะและลำคอเป็นเนื้องอกชนิดร้ายแรงที่เกิดขึ้นในบริเวณ ช่องปาก คอหอย กล่องเสียง และโพรงจมูก ซึ่งพบบ่อยเป็นอันดับที่ 6 จากทั่วโลก 50 เปอร์เซ็นต์ของผู้ป่วยมะเร็งชนิดนี้จะเสียชีวิต และพบว่า 5 เปอร์เซ็นต์ สามารถพัฒนาไปเป็นมะเร็งชนิดอื่น (1, 2)

การพัฒนาไปสู่โรคมะเร็งเกิดจากความบกพร่องของแอนติเจนที่ผิวเซลล์ ทำให้เกิดการสูญเสียหรือเหนี่ยวนำการทำงานของ MHC (major histocompatibility complex), immunosuppressive เช่น TGF- β , PGE2 และ adenosine หรือ cytokines เช่น IL-6 และ IL-10 ที่ต้านทานการเกิด apoptosis การแสดงออกของ Fas ligand (FasL) ที่จะไปยับยั้งเซลล์ภูมิคุ้มกันมะเร็ง tumor-infiltrating lymphocyte (TILs) (3-5) โดยเซลล์ที่ถูกกระตุ้นให้เป็นเซลล์มะเร็ง (tumor-associated macrophages) จะหลั่งโปรตีนที่มีผลทำให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่และการแพร่กระจาย เช่น TGF- β , VEGF, GM-CSF, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 และ MMPs (6-8) จึงมีการรุกรานและการแพร่กระจายไปยังต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำคอ (9) รวมทั้งมีความสามารถในการหลบหลีกภูมิคุ้มกันของร่างกายและทำให้กระบวนการตอบสนองเพื่อยับยั้งการเกิดมะเร็งแฉ่ลง (Antitumor response) (10)

มีเพียงเล็กน้อยที่สาเหตุของการเกิดโรคมะเร็งมาจากการเปลี่ยนแปลงของโรค แต่พบว่า 90 เปอร์เซ็นต์ มาจากการกลายพันธุ์ของระบบภายในร่างกายและปัจจัยแวดล้อม ซึ่งหลายภาวะแวดล้อมที่ทำให้เกิดโรคมะเร็ง มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรัง (11) มีงานวิจัยสนับสนุนว่า การอักเสบเรื้อรัง (Chronic inflammation) เป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้องไปกับการพัฒนาของโรคมะเร็ง โดยเซลล์ที่เกิดการอักเสบและไซโตไคน์ที่พบ มีส่วนทำให้เซลล์มะเร็งเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และลดการกระตุ้นภูมิคุ้มกันที่จะไปยับยั้งการเกิดเนื้องอก (12, 13) จึงมีคำกล่าวที่ว่า “มะเร็ง คือผลที่รักษาไม่หาย” (14)

มีการศึกษาว่าการอักเสบสามารถเพิ่มอัตราการกลายพันธุ์และส่งเสริมการแบ่งตัว โดยเกิดจากสารอนุมูลอิสระ reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen intermediates (RNI) ที่ถูกผลิตขึ้นมาจากเซลล์ macrophage หรือ neutrophils เหนี่ยวนำให้ DNA ถูกทำลายและยีนเสียเสถียรภาพไป เซลล์ที่อักเสบจะหลั่ง TNF- α cytokine ไปกระตุ้น ROS ให้สะสมใน epithelial cells รอบข้าง (15)

เซลล์ภูมิคุ้มกันหรือเซลล์ที่เกิดการอักเสบ จะถูกกระตุ้นผ่าน transcription factors เช่น NF- κ B และ STAT3 ไปควบคุมยีน pro angiogenesis เช่น IL-8, CXCL1, CXCL8 และ VEGF ในเซลล์ที่จะกลายเป็นมะเร็ง ให้เกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่เพื่อไปเลี้ยงเซลล์มะเร็ง (16)

การรุกรานของเซลล์มะเร็งเกิดขึ้นจากการสลายโปรตีนใน extracellular matrix ซึ่งเซลล์ที่เกิดการอักเสบเป็นแหล่งสำคัญที่จะช่วยการสลายโปรตีน โดยผลิต chemokine CCL9 ช่วยให้เกิดการหลั่ง matrix metalloproteinase MMP2 และ MMP9 (17) รวมทั้ง IL-1, TNF- α และ IL-6 ไปช่วยให้เกิดการแสดงออกของ MMP การรุกรานและการแพร่กระจาย ที่ถูกกระตุ้นผ่าน NF- κ B และ STAT3 (18) เช่นเดียวกับการเกิด anti-apoptosis โดยการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และ Bcl-X_L ซึ่งทั้ง transcription factors NF- κ B และ STAT3 ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการลดการสังเคราะห์โปรตีนต้านมะเร็ง p53 (19, 20)

จากรายงานว่าผู้ป่วยที่มีปัญหาสุขภาพช่องปากเป็นโรคปริทันต์อักเสบ และการสูญเสียฟัน มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคเหงือกเรื้อรังในตับอ่อน มะเร็งปอด มะเร็งทางเดินอาหาร รวมถึงมะเร็งในช่องปาก (21) โดยโรคปริทันต์อักเสบ (Periodontal disease) เกิดจากการอักเสบและมีการทำลายเนื้อเยื่อหรืออวัยวะรองรับรากฟัน เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคปริทันต์อักเสบเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมลบ รวมถึง *Porphyromonas gingivalis* (22)

monocytes/macrophages มีความสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันรวมถึงกระบวนการเกิดการอักเสบเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (23) มีความจำเพาะต่อ toll like receptor 4 (TLR4) (24) ไปเหนี่ยวนำให้เกิดการกระตุ้น NF- κ B และควบคุมยีนให้หลั่ง inflammatory cytokines เช่น IL-1, IL-6, IL-8 และ TNF- α รวมทั้ง enzyme iNOS และ COX-2 (25) ซึ่งเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอมีการหลั่ง MCP-1 และ TGF- β เพื่อไปกระตุ้นให้เซลล์ monocytes/macrophages เกิดการหลั่ง VEGF และ IL-8 โดยทั้งเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอและ monocytes/macrophages จะหลั่ง TNF- α และ IL-1 กลับมากกระตุ้นการหลั่ง VEGF และ IL-8 ในเซลล์มะเร็งอีกด้วย (26)

จากเหตุผลดังกล่าวเพื่อทำให้เกิดความเข้าใจของกลไกการเกิดโรคเหงือกเรื้อรังที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ จึงน่าจะมีการศึกษาผลจากการคัดหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์โมโนไซต์ เมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS จากแบคทีเรีย *Porphyromonas gingivalis* ที่ทำให้เกิดการอักเสบเรื้อรังในช่องปาก ต่อเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ชนิดปฐมภูมิ HN18 และชนิดแพร่กระจาย HN17 รวมไปถึงการแบ่งตัวและความสามารถในการแพร่กระจาย และการตายของเซลล์มะเร็ง

2. วัตถุประสงค์การทดลอง

1. ศึกษาผลของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 และ HN18 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ condition media ของเซลล์ human monocyte THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จากเชื้อ *P. gingivalis* ต่อการ สร้าง pro inflammatory cytokine และ chemokine ต่างๆ
2. ศึกษาความสามารถในการแบ่งตัวและการรุกรานของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 และ HN18
3. ศึกษาการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 และ HN18

3. วัสดุและวิธีการทดลอง

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

3.1.1 เลี้ยงเซลล์ human monocyte cell line THP-1 ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI (Gibco cat. No. 1800-022, USA) ที่มี 5% Fetal bovine serum (PAA, Austria, cat.no. A15-101) และ 1% Penicillin-Streptomycin (Capricorn Scientific GmbH, cat.no.PS-B, Germany) Incubated ที่ 37 องศา

เซลล์เชยส 5% CO₂ทำการเปลี่ยนอาหารเซลล์ทุก 2-3 วัน และ subculture เมื่อเซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวน 80% confluence

ทำการอดอาหาร (RPMI-Free serum) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเซลล์ให้ได้จำนวน 2×10^5 cells/ml ลงใน 6-well plate และใส่ LPS ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 0, 250, 500 และ 1,000 ng/ml จากนั้น Incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บ condition media เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

3.1.2 เลี้ยงเซลล์มะเร็งHN17 และ HN18 ด้วยอาหาร Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco cat. No. 12800-017, USA) ที่มี 5% fetal bovine serum และ 1% Penicillin-Streptomycin Incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ ทำการเปลี่ยนอาหารเซลล์ทุก 2-3 วันและ subculture เซลล์โดยใช้trypsin-EDTA นำไปเพาะเลี้ยงใหม่เมื่อเซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนถึงระดับ 80% confluence

3.2 วิธี Real time PCR เพื่อศึกษาการสร้าง proinflammatory cytokine ต่างๆ

นับเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ให้ได้จำนวน 1×10^5 cells/ml ลงใน 6-well plate incubated ที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการอดอาหาร (DMEM-Free serum) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และใส่ condition media ของ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วยLPS ความเข้มข้น 0, 250, 500 และ 1,000 ng/mlบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการสกัด RNA (Geneaid Biotech Ltd, Total RNA Mini Kit, cat.no. RB050, Taiwan) เพื่อวัดการแสดงออกของยีน IL-6 และ IL-8 ด้วยวิธี Real-time PCR โดยเปลี่ยน RNA เป็น cDNA ด้วย (PrimeScript RT TAKARA, cat.no.RR037A, Japan) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วย Syber-Green Reaction (KAPA biosystems, cat.no. KR0389, USA) โดยออกแบบสาย primer ดังนี้

Primer IL-6	Forward	5'- GTGAAAGCAGCAAAGAGGCAC - 3'
	Reverse	5'- CCAGTGATGATTTTCACCAGGC - 3'
Primer IL-8	Forward	5'- TCTGGACCCCAAGGAAAAGT - 3'
	Reverse	5'- AAGTTTCACTGGCATCTTCACTG- 3'
Primer GAPDH	Forward	5'- ATCACCATCTTCCAGGAG - 3'
	Reverse	5'- ATGGACTGTGGTCATGAG - 3'

3.3 การวัด cell proliferation ของเซลล์มะเร็งทั้ง HN17 และ HN18 ด้วยวิธี MTT

อดอาหารเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 (DMEM-Free serum) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับเซลล์ให้ได้จำนวน 10^4 cell/ml ลงใน 96 well plate และใส่ condition media ของ THP-1 ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในกลุ่มควบคุม ใส่ condition media จาก THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ng/ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ดูอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง หลังจากนั้นเติม working media ปริมาตร 150 ul และใส่ MTT (Sigma-Aldrich Pte Ltd, SINGAPORE) ความเข้มข้น 2mg/ml ปริมาตร 50 ul ห่อด้วย foil แล้ว incubate เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปวัดค่า MTT ด้วย microplate reader (Tecan, Sunrise TWTC) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วมาหาค่า percent of growth ดังสมการนี้

$$\text{Percent of growth (PG)} = \left(\frac{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม}} \right) \times 100$$

3.4 การวัด chemoinvasion ของเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18

3.4.1 เคลือบ Polycarbonate membrane pore size 13 micron ด้วย Matrigel (Corning.cat.no. 356234 NY) ความเข้มข้น 1 mg/ml ปริมาตร 50 ul แล้วทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.4.2 ใส่ condition media ของ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 ng/ml ปริมาตร 220 ul ลงใน lower chamber แล้ววาง membrane ที่เคลือบด้วย Matrigel ลงใน lower chamber นำเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ในสภาวะอดอาหาร (DMEM-Free serum) ปริมาณ 2×10^5 cell/ml ใส่ลงใน upper chamber ปริมาตร 200 μ l นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

เมื่อครบ 5 ชั่วโมง ทำการย้อมสีด้วย 0.5% crystal violet ที่ละลายด้วย 25% methanol ประมาณ 8-10 นาที และนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 2 ตา ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยการนับเซลล์จะนับ 5 field/membrane แล้วหาค่าเฉลี่ย

3.5 การวัด apoptosis ของเซลล์ ด้วยวิธี Annexin V-FITC flow cytometry

อดอาหารเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 (DMEM-Free serum) แล้วใส่ condition media ของ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 ng/ml incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น trypsinized เซลล์ด้วย trypsin-EDTA นับเซลล์ให้ได้ 2-5x10⁵ cell/ml นำมาย้อมสี Annexin V-FITC และ PI (Affymetrix Bioscience, Cat.no.BMS500FI-100, USA) แล้ววัดด้วยเครื่อง flow cytometry (Cytoflex, Beckman Counter, US)

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการศึกษาการแสดงออกของยีน การแบ่งตัว การรุกราน และการตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ ทำการทดสอบตัวอย่างละ 3 ครั้ง (n = 3) แล้วนำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของการวัด (Standard error of measurement; mean ± SEM) และเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$

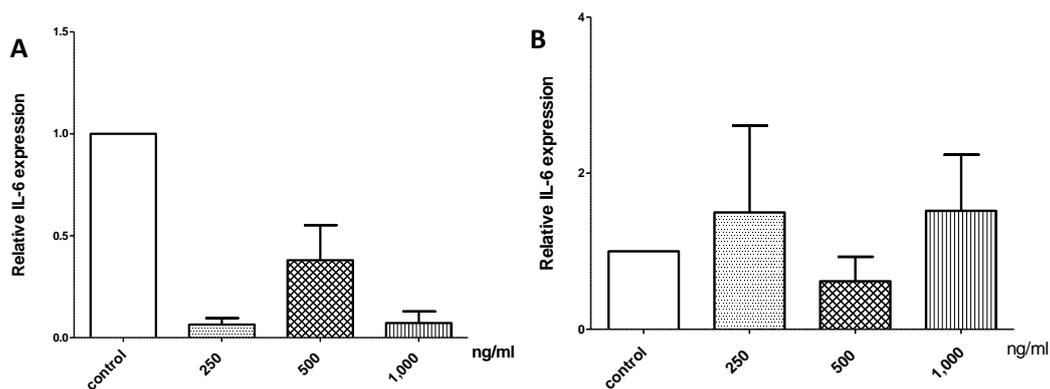
3.7 กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รหัสโครงการเลขที่ 33/2556 หนังสือรับรองเลขที่ 007/2558

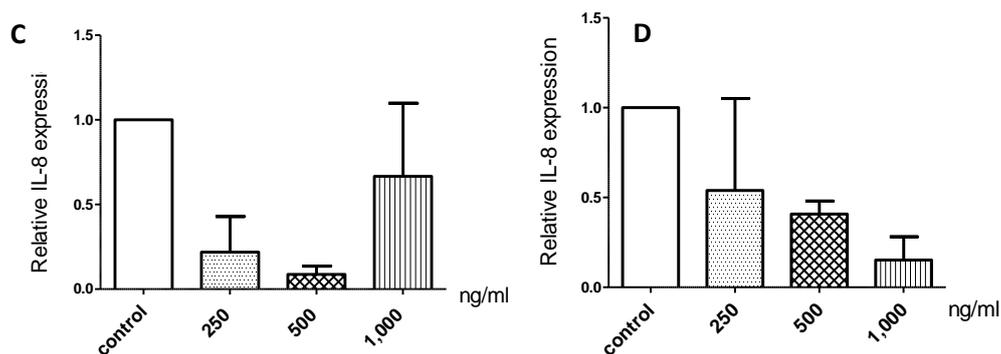
4. ผลการทดลอง

4.1 วัดการแสดงออกของยีน IL-6, IL-8 ด้วยวิธี Real-time PCR

จากการวัดการแสดงออกของยีน IL-6 และ IL-8 ในเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 จากการ incubated ร่วมกับ condition media ของ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าที่ 8 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีน IL-6 และ IL-8 ทั้งในเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงผลดังรูปที่ 1 และ 2



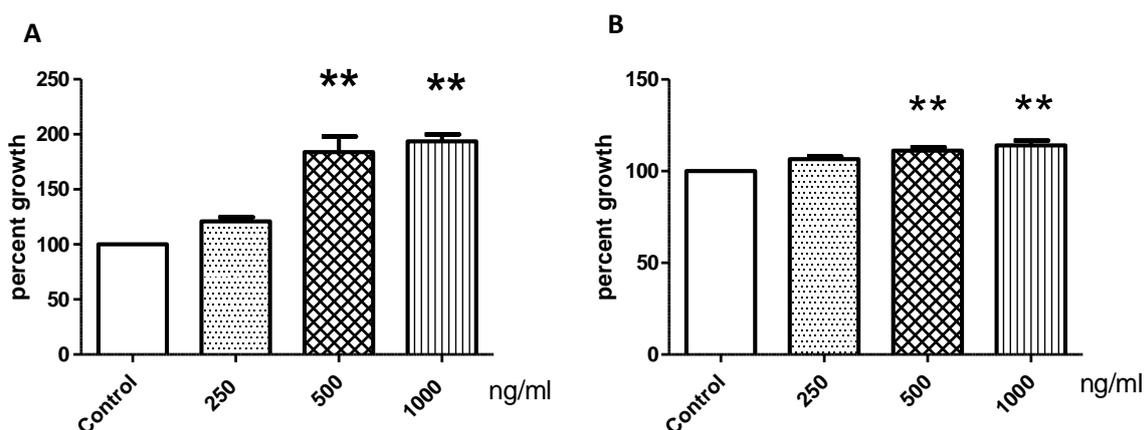
รูปที่ 1 การแสดงออกของยีน IL-6 ที่ 8 ชั่วโมง ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 (A) และ HN18 (B) ที่ incubated ร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P.gingivalis* ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,000 ng/ml (mean \pm SEM, n=3) เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 2 การแสดงออกของยีน IL-8 ที่ 8 ชั่วโมงโดยวิธี RT-PCR ของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 (C) และ HN18 (D) ที่ป่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ จากเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P.gingivalis* ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,000 ng/ml (mean \pm SEM, n=3) เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.2 วัด cell proliferation ของเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ด้วยวิธี MTT

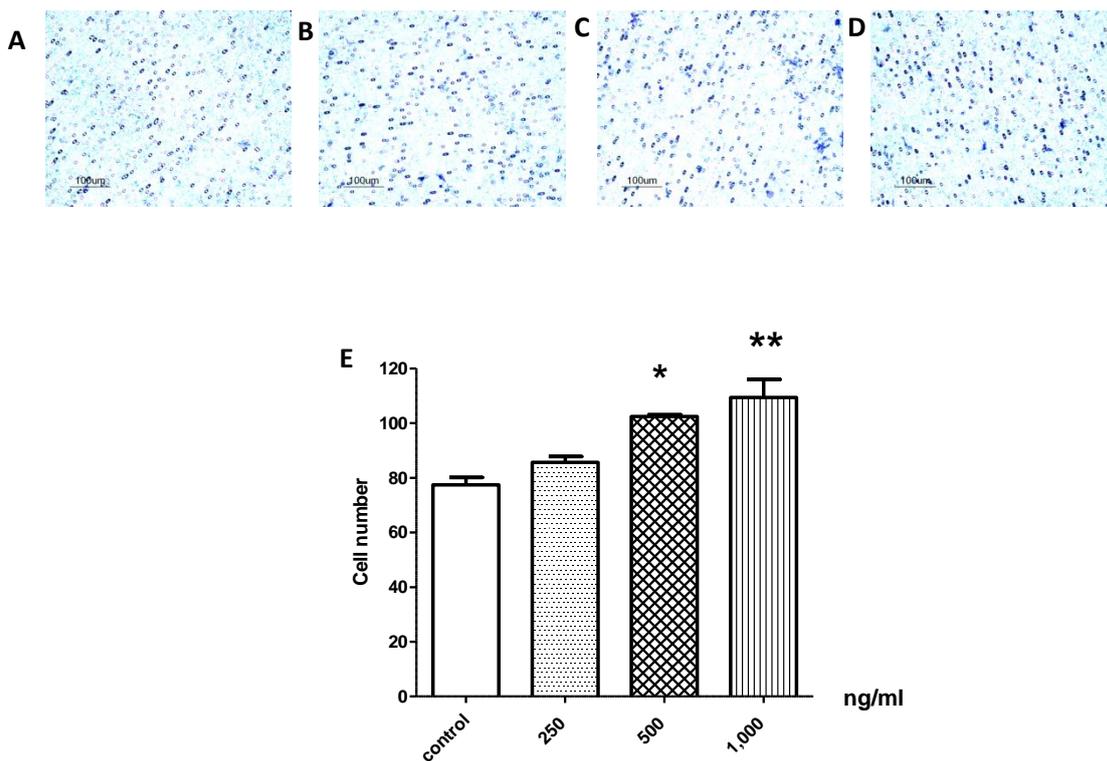
ผลของ cell proliferation จาก HN17 และ HN18 ต่อ condition media ของ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จากเชื้อ *P. gingivalis* ที่ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 ng/ml พบว่าค่า percent growth ของเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ng/ml มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น โดยแปรผันตามความเข้มข้นของ LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 3



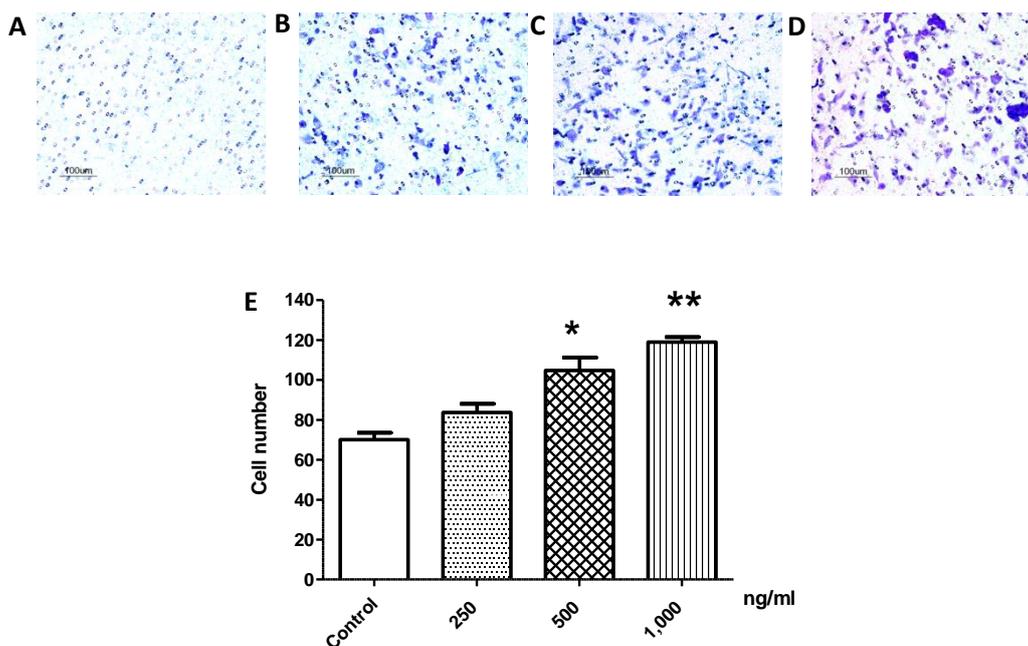
รูปที่ 3 ความสามารถในการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 (A) และ HN18 (B) จากการ incubated ร่วมกับ condition media ของเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P. gingivalis* ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1,000ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยวิธี MTT (mean \pm SEM, n=3) เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.3 การวัด chemoinvasion ของเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ด้วยวิธี Boyden's chamber

ผล chemoinvasion จากเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 ต่อ condition media ของ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P. gingivalis* ความเข้มข้น 250, 500, 1,000 ng/ml เทียบกับกลุ่มควบคุม (control) พบว่าที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 ng/ml มีการรุกรานของเซลล์มะเร็ง ทั้ง 2 ชนิดผ่าน membrane ที่เคลือบด้วย Matrigel เพิ่มมากขึ้น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 4 และ รูปที่ 5



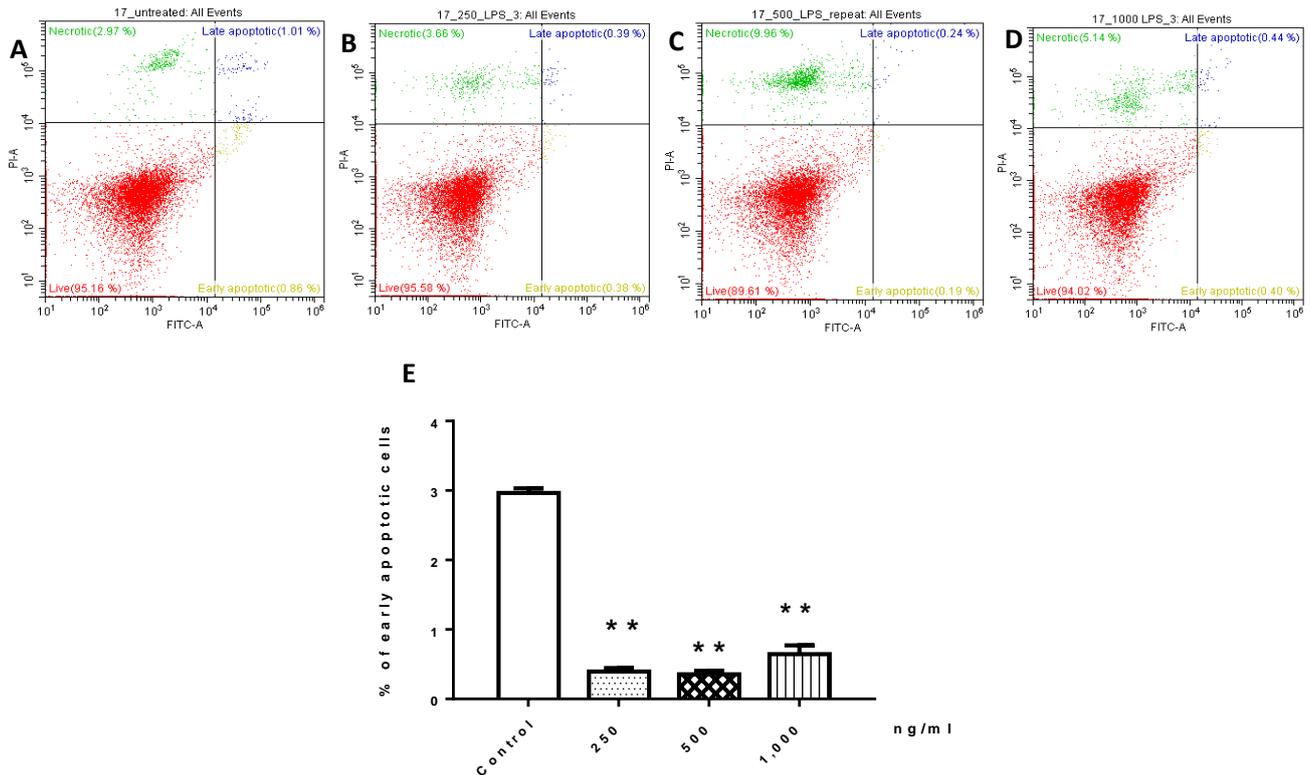
รูปที่ 4 การรูกกล้าของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 ผ่าน membrane ที่เคลือบด้วย Matrigel จากการ incubated ร่วมกับ condition media ของเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P.gingivalis* ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 (A), 250 (B), 500 (C) และ 1,000 (D) ng/ml เซลล์ถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 2 ตา ที่กำลังขยาย 400 เท่า (mean \pm SEM, n=3) Bar=100 μ m เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ * p <0.05, ** p <0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (E)



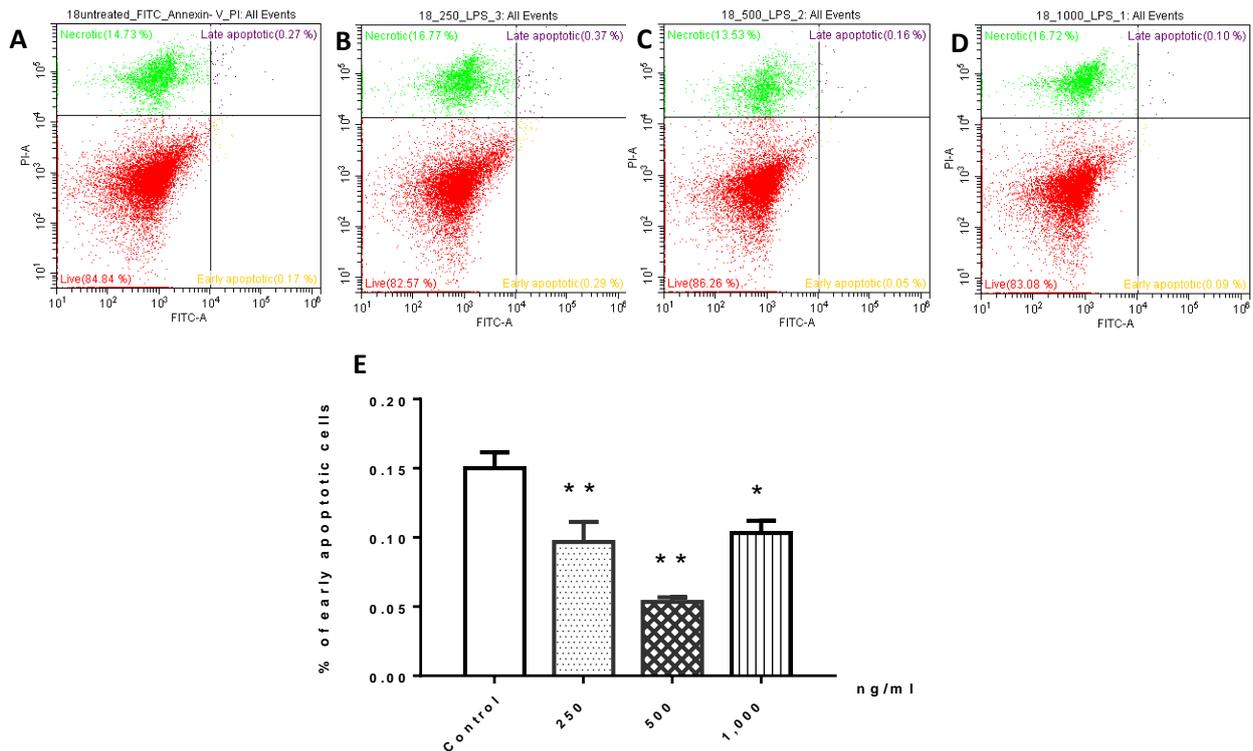
รูปที่ 5 การรูกกล้าของเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN18 ผ่าน membrane ที่เคลือบด้วย Matrigel จากการ incubated ร่วมกับ condition media ของเซลล์โมโนไซต์จากมนุษย์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P.gingivalis* ความเข้มข้นตั้งแต่ 0 (A), 250 (B), 500 (C) และ 1,000 (D) ng/ml เซลล์ถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 2 ตา ที่กำลังขยาย 400 เท่า (mean \pm SEM, n=3) Bar=100 μ m เปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ * p <0.05, ** p <0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (E)

4.4 วัด apoptosis ของเซลล์ ด้วยวิธี Annexin V- FITC flow cytometry

เมื่อทดลองนำอาหารเลี้ยงเซลล์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 ng/ml มา incubated ร่วมกับเซลล์มะเร็ง HN17 และ HN18 พบว่าในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่บ่มร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ของ THP-1 ที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p <0.05) ซึ่งแสดงผลดังรูปที่ 6 และ 7



รูปที่ 6 อัตราการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง HN17 เมื่อบ่มเลี้ยงร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วของเซลล์ THP-1 โดย LPS จาก *P.gingivalis* กลุ่มควบคุม (A) ความเข้มข้น 250 (B), 500 (C) และ 1,000(D) ng/ml โดยย้อมสี Annexin V - FITC และ PI วัดด้วยวิธี Flow cytometry และแสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ $**p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (mean \pm SEM, n=3) (E)



รูปที่ 7 อัตราการเกิด apoptosis ในเซลล์มะเร็ง HN17 เมื่อบ่มเลี้ยงร่วมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นแล้วของเซลล์ THP-1 โดย LPS จากเชื้อ *P.gingivalis* กลุ่มควบคุม (A) ความเข้มข้น 250 (B), 500 (C) และ 1,000 (D) ng/ml โดยย้อมสี Annexin V - FITC และ PI วัดด้วยวิธี flow cytometry และแสดงการเปรียบเทียบผลทางสถิติโดยใช้ One-way analysis of variance (ANOVA) และตามด้วย Dunnett's test ที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติ * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (mean \pm SEM, n=3) (E)

5. วิจัยารณ์ผล

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ THP-1 ด้วย LPS จาก *P.gingivalis* ที่เป็นสาเหตุของการอักเสบในโรคปริทันต์อักเสบ และจากการเลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งชนิดปฐมภูมิ HN17 และชนิดแพร่กระจาย HN18 พบว่ามีการแสดงออกของยีน IL-6 และ IL-8 และมีผลทำให้เพิ่มความสามารถในการแบ่งตัว และการรุกรานมากขึ้นตามความเข้มข้นของการกระตุ้นด้วย LPS ที่มากขึ้นด้วย และส่งผลให้มีการตายแบบ apoptosis ในเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิดลดลง

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การอักเสบเรื้อรังในโรคปริทันต์อักเสบ ที่มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียแกรมลบ *P.gingivalis* มีความเชื่อมโยงและความเป็นไปได้ที่จะเกิดการพัฒนามาเป็นรอยโรคมะเร็งศีรษะและลำคอ และทำให้มะเร็งมีความรุนแรงมากขึ้นโดยเซลล์โมโนไซต์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS จาก *P.gingivalis* จะหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งถูกกระตุ้นจากตัวรับ toll-like receptor 4 (TLR4) ผ่านวิถีส่ง

สัญญาณภายในเซลล์ NF- κ B, MAPK, p38, JNK และ ERK (27) เหนี่ยวนำให้เกิดการหลั่ง IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α เอนไซม์ iNOS และ COX-2 (25) ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่มีบทบาทส่งเสริมในการเจริญเติบโตในเซลล์มะเร็ง (28-31) *P.gingivalis* ยังไปกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง IL-8, MMP-1, MMP-2, MMP-9 และ MMP-13 ในเซลล์มะเร็งช่องปาก (OSCC) ทำให้เกิดการรุกรานมากขึ้น (32, 33) รวมทั้งพบว่าในเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ มีการยับยั้งการกระตุ้นตัวรับ Fas/FasL ซึ่งจะเข้าไปกระตุ้นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มแคสเปส ลดการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ apoptosis จากไมโทคอนเดรียใน T cell (10) กระบวนการเกิด apoptosis ตามปกติของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจาก LPS ผ่าน toll like receptor 3 และ 4 (34) ตัวรับ TNF, FAS หรือ TRAIL เมื่อถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์แคสเปส จะทำให้เริ่มเกิดการตายแบบ necrosis ซึ่งมาจากการกระตุ้นของ protein kinase RIP1 ส่งสัญญาณไปยังไมโทคอนเดรีย นำไปสู่การทำลาย plasma membrane ส่งผลให้มีการอักเสบมากขึ้น (35) จากการไปยับยั้ง anti-inflammatory cytokines เช่น IL-10 และ TGF- β และปล่อย pro inflammatory mediator เช่น TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 และ MMP-2 กระบวนการเหล่านี้จะไปกระตุ้นวิถีของ NF- κ B ให้ยับยั้งการเกิด apoptosis และเพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็ง (36, 37) จึงเป็นเหตุผลว่า กระบวนการตายแบบ necrosis ที่เกิดจากการอักเสบแบบเรื้อรัง มีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของการเกิดโรคมะเร็งด้วย (38) องค์ประกอบที่เป็นสภาวะแวดล้อมของเซลล์มะเร็ง (tumor microenvironment) โดยเฉพาะการหลั่งสารพวก cytokines, chemokines, growth factors และ protease enzymes เหล่านี้ จึงมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาและการแพร่กระจายของมะเร็ง (39)

มีการศึกษาจากการเลี้ยงเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS/IFN- γ ร่วมกับเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 พบว่ามีการหลั่งของ TNF- α ซึ่งเป็นไซโตไคน์ที่ช่วยควบคุมการเกิด apoptosis ลดลง แต่มีการหลั่ง IL-8 และ IL-10 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับการเลี้ยงร่วมกับเซลล์แมโครฟาจที่ไม่ได้ถูกกระตุ้น และมีผลสอดคล้องกันเมื่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง MCF-7 ร่วมกับยับยั้งการเกิด apoptosis Bcl-2 และเซลล์มะเร็งที่ต้านทานการเกิด apoptosis เช่น มะเร็งลำไส้ใหญ่ (RKO) (40) ซึ่งเป็นไปตามผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ THP-1 ด้วย LPS เลี้ยงร่วมกับเซลล์มะเร็งศีรษะและลำคอ HN17 และ HN18 มีผลทำให้มีการเกิด apoptosis น้อยลงเช่นกัน

จากการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการถูกกระตุ้นให้เกิดการอักเสบในเซลล์โมโนไซต์ จากเชื้อจุลชีพในช่องปาก ในโรคปริทันต์มีบทบาทสำคัญในกระบวนการก่อมะเร็ง การพัฒนาและการแพร่กระจายของมะเร็ง ซึ่งผลการศึกษาจะนำไปสู่การพัฒนาการรักษาและป้องกันโรคมะเร็งศีรษะและลำคอต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Curado MP, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr Opin Oncol*. 2009;21(3):194-200.
2. Jennifer R. Grandis JAP, Joel S. Greenberger, Richard A. Pelroy and Suresh Mohla. Head and Neck Cancer: Meeting Summary and Research Opportunities. *cancer research*. 2004;64:8126-9.
3. Costello RT GJ, Olive D. Tumor escape from immune surveillance. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1999;47(2):83-8.
4. Whiteside TL. Tumor- induced death of immune cells: its mechanisms and consequences. *Semin Cancer Biol*. 2002;12(1):43-50.
5. Hoskin DW, Mader JS, Furlong SJ, Conrad DM, Blay J. Inhibition of T cell and natural killer cell function by adenosine and its contribution to immune evasion by tumor cells (Review). *Int J Oncol*. 2008;32(3):527-35.
6. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research*. 2006;66(2):605-12.
7. Lamagna C, Aurrand-Lions M, Imhof BA. Dual role of macrophages in tumor growth and angiogenesis. *J Leukocyte Biol*. 2006;80(4):705-13.
8. Coffelt SB, Hughes R, Lewis CE. Tumor- associated macrophages: Effectors of angiogenesis and tumor progression. *Bba-Rev Cancer*. 2009;1796(1):11-8.
9. Nigel J. P. Beasley RP, Suneale Banerji, Russell D. Leek, John Moore, Philippe van Trappen, Graham Cox ALH, and David G. Jackson. Intratumoral Lymphangiogenesis and Lymph Node Metastasis in Head and Neck Cancer. *cancer research*. 2002;62.
10. Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune Suppression in Head and Neck Cancers: A Review. *Clinical and Developmental Immunology*. 2010;2010:1-15.
11. Aggarwal BB. Targeting inflammatory pathways for prevention and treatment of cancer. *Eur J Cancer*. 2016;54:S66-S.
12. Multhoff G, Molls M, Radons J. Chronic inflammation in cancer development. *Front Immunol*. 2012;2.
13. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539-45.
14. Dvorak HF. Tumors: Wounds That Do Not Heal. *N Engl J Med*. 1986;315:1650-9.

15. Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC. Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(4):276-85.
16. Kujawski M, Kortylewski M, Lee H, Herrmann A, Kay H, Yu H. Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. *J Clin Invest*. 2008;118(10):3367-77.
17. Kitamura T, Kometani K, Hashida H, Matsunaga A, Miyoshi H, Hosogi H, et al. SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1(+) myeloid cells that promote invasion. *Nat Genet*. 2007;39(4):467-75.
18. Yu H, Kortylewski M, Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007;7(1):41-51.
19. Karin M. Nuclear factor-kappa B in cancer development and progression. *Nature*. 2006;441(7092):431-6.
20. Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. *Carcinogenesis*. 2009;30(7):1073-81.
21. Michaud DS, Fu ZX, Shi J, Chung M. Periodontal Disease, Tooth Loss, and Cancer Risk. *Epidemiol Rev*. 2017;39(1):49-58.
22. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of Periodontal Diseases. A Review. *Biotechnol Biotec Eq*. 2013;27(3):3754-9.
23. Zhang G, Meredith TC, Kahne D. On the essentiality of lipopolysaccharide to Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16(6):779-85.
24. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2001;1(2):135-45.
25. Chanput W, Mes J, Vreeburg RAM, Sayelkoul HFJ, Wichers HJ. Transcription profiles of LPS-stimulated THP-1 monocytes and macrophages: a tool to study inflammation modulating effects of food-derived compounds. *Food Funct*. 2010;1(3):254-61.
26. Liss C, Fekete MJ, Hasina R, Lam CD, Lingen MW. Paracrine angiogenic loop between head-and-neck squamous-cell carcinomas and macrophages. *Int J Cancer*. 2001;93(6):781-5.
27. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001;13(2):85-94.
28. Pries R, Thiel A, Brocks C, Wollenberg B. Secretion of tumor-promoting and immune suppressive cytokines by cell lines of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo*. 2006;20(1):45-8.

29. Van Waes C. Nuclear factor-kappa 13 in development, prevention, and therapy of cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(4):1076-82.
30. Nibali L, Fedele S, D'Aiuto F, Donos N. Interleukin-6 in oral diseases: a review. *Oral Dis.* 2012;18(3):236-43.
31. Buchanan FG, Wang DZ, Bargiacchi F, DuBois RN. Prostaglandin E-2 regulates cell migration via the intracellular activation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2003;278(37):35451-7.
32. Ha NH, Park DG, Woo BH, Kim DJ, Il Choi J, Park BS, et al. Porphyromonas gingivalis increases the invasiveness of oral cancer cells by upregulating IL-8 and MMPs. *Cytokine.* 2016;86:64-72.
33. Yee M, Kim S, Sethi P, Duzgunes N, Konopka K. Porphyromonas gingivalis stimulates IL-6 and IL-8 secretion in GMSM-K, HSC-3 and H413 oral epithelial cells. *Anaerobe.* 2014;28:62-7.
34. Xu Y, Kim SO, Li YL, Han JH. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem.* 2006;281(28):19179-87.
35. Proskuryakov SY, Gabai VL. Mechanisms of Tumor Cell Necrosis. *Curr Pharm Design.* 2010;16(1):56-68.
36. Proskuryakov SY, Gabai VL, Konoplyannikov AG, Zamulaeva IA, Kolesnikova AI. Immunology of apoptosis and necrosis. *Biochemistry-Moscow+.* 2005;70(12):1310-20.
37. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1175-83.
38. Vakkila J, Lotze MT. Opinion - Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(8):641-8.
39. Malinee Thanee, Puangrat Yongvanit, Watcharin Loilome. Tumor Microenvironment and its Functions. *Srinagarind Med J* 2012: 27(4):424-32
40. Weigert A, Tzieply N, von Knethen A, Johann AM, Schmidt H, Geisslinger G, et al. Tumor cell apoptosis polarizes macrophages - Role of sphingosine-1-phosphate. *Mol Biol Cell.* 2007;18(10):3810-9.